

METHOD FOR INTRODUCING AND INCLUDING FOREIGN MATERIAL IN ORGANISM OR CELL AND APPARATUS THEREFOR

Bibliographic data

Mosaics

Original document

INPADOC legal status

Publication number: JP6062871

Publication date: 1994-03-08

Inventor: ICHIKAWA MASAYOSHI; TERASAWA HIDEO; KIKUTA MASATO

Applicant: KANSAI PAINT CO LTD

Classification:

- International: C12M1/04; C12N15/09; C12N15/07; C12M1/00; C12N15/09; C12N15/07; (IPC1-7): C12N15/07; C12M1/00

- Europe:

Application number: JP19920103770 19920331

Priority number(s): JP19920103770 19920331

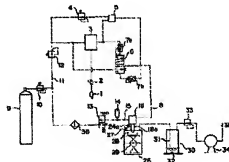
View INPADOC patent family

View list of citing documents

Report a data error here

Abstract of JP6062871

PURPOSE: To prevent the contamination caused by the scattering of particles carrying foreign materials by closing a two-stage needle valve, charging fine particles carrying foreign material in a 1st inner hole and ejecting the fine particles through a nozzle by operating the two-stage needle valve. **CONSTITUTION:** A compressed gas having high pressure is ejected or stopped by opening or closing an air-operated valve 6 controlled by a controller 3 programmed to perform a prescribed on-off operation. A container 28 containing the specimen of cell or organism is placed on a thermostatic table to receive foreign material-supporting fine particles in optimum temperature state. In the preferable embodiment of the apparatus, the gas ejected from the tip of a nozzle 18a is not applied to the organism or the cell and the foreign material-supporting fine particles scattered to the surrounding are passed through a chamber 26 and transferred to a separator 30. The fine particles are captured by the liquid 32 in the separator 30 and removed from the gas. Exclusively the gas free from the fine particles carrying the foreign material is exhausted from an exhaust port 35.



特開平6-62871

(43) 公開日 平成6年(1994)3月8日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/87				
C 1 2 M 1/00	A	8931-4B	C 1 2 N 15/00	A

審査請求 未請求 請求項の数 8 (全 8 頁)

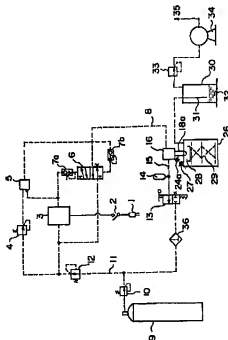
(21) 出願番号	特願平4-103770	(71) 出願人	000001409 関西ペイント株式会社 兵庫県尼崎市神崎町33番1号
(22) 出願日	平成4年(1992)3月31日	(72) 発明者	市川 正義 神奈川県平塚市東八幡4丁目17番1号 関 西ペイント株式会社内
		(72) 発明者	寺沢 秀夫 神奈川県平塚市東八幡4丁目17番1号 関 西ペイント株式会社内
		(72) 発明者	菊田 真人 神奈川県平塚市東八幡4丁目17番1号 関 西ペイント株式会社内
		(74) 代理人	弁理士 片桐 光治

(54) 【発明の名称】 生物または細胞に異物を導入し取り込ませる方法および該方法に使用する装置

(57) 【要約】 (修正有)

【目的】 遺伝子等の異物を金属、ポリマー等の微粒子に担持した異物担持微粒子を生物又は細胞に打ち込み導入する方法及び装置の提供。

【構成】 ノズルチップの孔とこれと順次連通する第1弁座、第1内孔、第2弁座および第2内孔と第1内孔に通ずるコックバルブ付異物担持微粒子挿入口とを有し、自動ガンに装着されたノズルと、自動ガンの作動に連動して第1弁座および第2弁座において開閉する弁体とより2段ニードル弁を構成してなるノズルシステムの2段ニードル弁を開として第1内孔に異物担持微粒子を装入し、2段ニードル弁を作動させて異物担持微粒子をノズル先端より噴出させ、生物または細胞に衝突させるか、あるいは第2弁座を自動ガンの高圧圧縮気体出口部に設け、ノズル先端部を離手により着脱自在の構造とすること以外、前記と同様の2段ニードル弁を用いる、好ましくは、噴出後周囲に飛散する異物担持微粒子を分離・回収することを特徴とする。



1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 異物を微粒子に担持させてなる異物担持微粒子を高圧圧縮気体と共にノズルに先端から噴出させて所定温度に維持された生物または細胞に打ち込む生物または細胞に異物を導入し取り込ませる方法において、所定の長さおよび内径を有するノズルチップの孔と該ノズルチップの軸上これと順次連通する第1弁座、所定の長さおよび内径を有する第1内孔、および第2弁座および所定の長さおよび内径を有する第2内孔と前記第1内孔に通ずるコックバルブ付異物担持微粒子挿入口とを有し、エアレススプレー塗装用自動ガンに装着されたノズルと、該エアレススプレー塗装用自動ガンの作動に応じ前記ノズルチップの軸上前後に作動して前記第1弁座および第2弁座において開閉する弁体とより2段二ードル弁を構成してなるノズルシステムの2段二ードル弁によって第1内孔を開の状態にして異物担持微粒子挿入口より第1内孔に異物担持微粒子を挿入して前記コックバルブを閉め、2段二ードル弁を作動させて第1内孔を開の状態として所定圧の高圧圧縮気体を所定時間第2内孔を通して第1内孔に導入させ、第1内孔に導入された高圧圧縮気体と共に第1内孔に導入されている異物担持微粒子をノズルチップの孔を通してノズル先端から所定の速度で噴出させることを特徴とする前記生物または細胞に異物を導入し取り込ませる方法。

【請求項2】 異物を微粒子に担持させてなる異物担持微粒子を高圧圧縮気体と共にノズル先端から噴出させて所定温度に維持された生物または細胞に打ち込む生物または細胞に異物を導入し取り込ませる方法において、所定の長さおよび内径を有するノズルチップの孔と該ノズルチップの軸上これと順次連通する第1弁座、および所定の長さおよび内径を有する内孔と前記内孔に通ずるコックバルブ付異物担持微粒子挿入口とを有し、前記自動ガンに装着されたノズルであって該挿入口よりノズル先端に至るノズル部分が着脱自在に接続されている前記ノズルと、該エアレススプレー塗装用自動ガンの作動に応じ前記ノズルチップの軸上作動して前記第1弁座および前記エアレススプレー塗装用自動ガンの高圧圧縮気体出口部に設けられた第2弁座において開閉する弁体とより2段二ードル弁を構成してなるノズルシステムの2段二ードル弁によって内孔を開の状態にして、異物担持微粒子挿入口より内孔に異物担持微粒子を挿入して前記コックバルブを閉め、2段二ードル弁を作動させて内孔を開の状態として所定圧の高圧圧縮気体を所定時間内孔に導入させ、内孔に導入された高圧圧縮気体と共に内孔に導入されている異物担持微粒子をノズルチップの孔を通してノズル先端から所定の速度で噴出させることを特徴とする前記生物または細胞に異物を導入し取り込ませる方法。

【請求項3】 高圧圧縮気体源出口に高圧調整用レギュレータを設けて調圧された高圧圧縮気体を分岐した一方

2

に低圧調整用レギュレータを設けて減圧された低圧圧縮気体を制御用圧縮気体および作用用圧縮気体として使用し、自動ガンに至る他方に高圧ガス用フィルタ、オンオフバルブおよび高圧アクチュエータを順次設け、自動ガンに至るラインに高圧圧縮気体を導入後、オンオフバルブを開めてそれより自動ガンに至るラインの高圧圧縮気体を自動ガンに供給する請求項1または2記載の方法。

【請求項4】 噴出される異物担持微粒子のうち周囲に飛散する部分を回収する請求項1または2記載の方法。

【請求項5】 内蔵する開閉弁の作動時間を設定するコントローラ、該コントローラをオンすると設定された短時間のみ開閉弁が開いて制御用圧縮気体が流れて開く空気作動弁、空気作動弁を通過した作用用圧縮気体により作動して高圧圧縮気体源からノズル先端に高圧圧縮気体を供給するエアレススプレー塗装用自動ガン、開閉弁が閉じ制御用圧縮気体の供給が止まると経路内の制御用圧縮気体を速やかに排出するように作動するNOT素子および急速排気弁、該自動ガンの先端に取り付けられたノズルシステムおよび生物または細胞の固定手段よりなり、該ノズルシステムが所定の長さおよび内径を有するノズルチップの孔と該ノズルチップの軸上これと順次連通する第1弁座、所定の長さおよび内径を有する第1内孔、第2弁座、および所定の長さおよび内径を有する第2内孔と前記第1内孔に通ずるコックバルブ付異物担持微粒子挿入口とを有し、エアレススプレー塗装用自動ガンに装着されたノズルと、該エアレススプレー塗装用自動ガンの作動に応じ前記ノズルチップの軸上前後に作動して前記第1弁座および第2弁座において開閉する弁体とより2段二ードル弁を構成してなることを特徴とする請求項1記載の方法に使用する装置。

【請求項6】 内蔵する開閉弁の作動時間を設定するコントローラ、該コントローラをオンすると設定された短時間のみ開閉弁が開いて制御用圧縮気体が流れて開く空気作動弁、空気作動弁を通過した作用用圧縮気体により作動して高圧圧縮気体源からノズル先端に高圧圧縮気体を供給するエアレススプレー塗装用自動ガン、開閉弁が閉じ制御用圧縮気体の供給が止まると経路内の制御用圧縮気体を速やかに排出するように作動するNOT素子および急速排気弁、該自動ガンの先端に取り付けられたノズルシステムおよび生物または細胞の固定手段よりなり、該ノズルシステムが所定の長さおよび内径を有するノズルチップの部と該ノズルチップの軸上これと順次連通する第1弁座、および所定の長さおよび内径を有する内孔と前記内孔に通ずるコックバルブ付異物担持微粒子挿入口とを有し、前記自動ガンに装着され、好ましくは該挿入口前において着脱自在に接続されたノズルと、該エアレススプレー塗装用自動ガンの作動に応じ前記ノズルチップの軸上前後に作動して前記第1弁座および前記エアレススプレー塗装用自動ガンの高圧圧縮

3

気体出入口部に設けられた第2弁座において開閉する弁体とより2段ニードル弁を構成してなることを特徴とする請求項2記載の方法に使用する装置。

【請求項7】 高圧圧縮気体源からエアレスブレイ塗装用自動ガンに至るラインに、高圧調整用レギュレータ、高圧圧縮気体分岐ライン、高圧ガス用フィルター、オンオフ手動バルブおよび高圧アキュムレータを順次設け、前記高圧圧縮気体分岐ラインに低圧調整用レギュレータを設けてなり、該低圧調整用レギュレータにより減圧された低圧圧縮気体を制御用圧縮気体および作動用圧縮気体として用いられる請求項5または6記載の装置。

【請求項8】 所定の内圧に比して所定の容積を有し、生物または細胞の固定手段を収納し、前記ノズルに装着自在に接続して設けられた安全付チャンパー、該チャンパーで膨張し、該チャンパーを出る膨張気体に同拌される飛散異物担持微粒子を分離回収する分離器、および該分離器で分離された気体を吸引して瞬時の昇圧を防止する真空度調整レギュレータおよび真空ポンプを設けてなる請求項5または6記載の装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、遺伝子などの異物を金属、ポリマーなどの微粒子に担持してなる異物担持微粒子を、化学的および生物学的損傷なしに最低限の物理学的損傷のみで、生物または細胞に打ち込むことにより生物または細胞に異物を導入し取り込ませる方法の改良および該方法に使用する装置に関する。

【0002】

【従来の技術および課題】 特開平3-251187号公報には、異物を微粒子に担持させてなる異物担持微粒子を、所定の長さおよび内径を有するノズルチップ部の孔と、このノズルチップ孔の軸上これと連通し、所定の長さおよび該ノズルチップ孔よりも十分大きな所定の内径を有して異物担持微粒子を装着しうる異物担持微粒子装着孔とよりなるノズルの該異物担持微粒子装着孔に装着し、所定圧力の圧縮気体を所定の時間該ノズルに噴出させながらノズル先端から該異物担持微粒子を噴出させて所定温度に維持された生物または細胞に打ち込むか、あるいは異物担持微粒子を前記装着孔に装着後、該異物担持微粒子装着孔の圧縮気体入口部に、その径が装着孔の内径よりも小さくかつノズルチップ孔のそれよりも大い円筒状ストッパーを配置し、該ノズルに所定圧の圧縮気体を、該ストッパーがノズルチップ孔と前記装着孔との連通部で停止するまでの所定時間または所定距離だけ供給しながら、ノズル先端から該異物担持微粒子を系内に充填されている気体と共に噴出させて所定温度に維持された生物または細胞に打ち込むことを特徴とする生物または細胞に異物を導入し取り込ませる方法ならびに該方法に使用される装置が開示されている。

【0003】 特開平3-251187号公報に記載され

4

ている方法および装置においては、ノズルの構造上、異物担持微粒子の噴出方向がほぼ水平方向に限定されること、ノズルの構造上特に異物担持微粒子装着孔内に円筒状ストッパーを配置した場合、異物担持微粒子の異物担持微粒子装着孔への装着操作が面倒であること、ノズルチップ孔の先端に任意に取り付けられるひも付き栓を用いる場合、その耐久性が十分でないこと、ノズル先端から高圧圧縮気体と共に噴出される異物担持微粒子のうち1部分は周囲に飛散し汚染の原因となること、開閉弁の作動時間を設定するコントローラの故障による高圧気体の噴出を防止できないことなどの問題点があった。

【0004】 本発明は、上記した従来技術における問題点を解決するためになされたもので、ノズルチップ孔の先端から噴出される異物担持微粒子の噴出方向が特定方向に限定されることがないこと、ノズル内の異物担持微粒子の装着操作が簡単であること、ノズル先端より噴出される異物担持微粒子であって周囲に飛散する部分による汚染を有効かつ安全に防止することが可能であること、ノズルへの高圧圧縮気体の供給制御を安全かつ有効に行うことが可能であることなどの利点を有する生物または細胞に異物を導入し取り込ませる方法および該方法に使用される装置を提供することを目的とするものである。

【0005】

【問題点を解決するための手段】 本発明は、第1に異物を微粒子に担持させてなる異物担持微粒子を高圧圧縮気体と共にノズル先端から噴出させて所定温度に維持された生物または細胞に打ち込む生物または細胞に異物を導入し取り込ませる方法において、所定の長さおよび内径を有するノズルチップの孔と該ノズルチップ孔の軸上これと順次連通する第1弁座、所定の長さおよび内径を有する第1内孔、第2弁座、および所定の長さおよび内径を有する第2内孔と前記第1内孔に通ずるコックバルブ付異物担持微粒子挿入孔とを有し、エアレスブレイ塗装用自動ガンに装着されたノズルと、該エアレスブレイ塗装用自動ガンの作動に応じて前記ノズルチップ孔の軸上前後に作動して前記第1弁座および第2弁座において開閉する弁体とより2段ニードル弁を構成してなるノズルシステムの2段ニードル弁によって第1内孔を開閉した状態で異物担持微粒子挿入口より第1内孔に異物担持微粒子を導入して前記コックバルブを開閉、2段ニードル弁を作動させて第1内孔を開閉の状態として所定圧の高圧圧縮気体を所定時間第2内孔を通して第1内孔に導入させ、第1内孔に導入された高圧圧縮気体と共に第1内孔に導入されている異物担持微粒子をノズルチップ孔を通してノズル先端から所定の速度で噴出させること、あるいは所定の長さおよび内径を有するノズルチップの孔と該ノズルチップ孔の軸上これと順次連通する第1弁座、および所定の長さおよび内径を有する内孔と前記内孔に通ずるコックバルブ付異物担持微粒子挿入口とを有

し、前記自動ガンに装着され、好ましくは該挿入口前において着脱自在に接続されたノズルと、該エアレススプレー塗装用自動ガンの作動に応じて前記ノズルチップ孔の軸上前後に作動して前記第1弁座および前記エアレススプレー塗装用自動ガンの高圧圧縮気体出口部に設けられた第2弁座において開閉する弁体とより2段ニードル弁を構成してなるノズルシステムの2段ニードル弁によって内孔を開閉の状態にして、異物保持微粒子挿入口より内孔に異物保持微粒子を導入して前記コックバルブを閉め、2段ニードル弁を作動させて内孔を開の状態として所定圧の高圧圧縮気体を所定時間内孔に導入させ、内孔に導入された高圧圧縮気体と共に内孔に導入されている異物保持微粒子をノズルチップ孔を通過してノズル先端から所定の速度で噴出させることによりなり、好ましくはさらに高圧圧縮気体出口部に高圧調整用レギュレータを設けて調整された高圧圧縮気体を分岐後、一方に低圧調整用レギュレータを設けて減圧された低圧圧縮気体を制御用圧縮気体および作用用圧縮気体として使用し、他方の自動ガンに至るラインに、高圧ガス用フィルタ、オンオフバルブおよび高圧アキュムレータを順次設け、該ラインに高圧圧縮気体を導入後、オンオフバルブを閉め、オンオフバルブから自動ガンに至るラインの高圧圧縮気体を自動ガンに供給し、噴出される異物保持微粒子のうち周囲に飛散する部分を回収することを特徴とする前記生物または細胞に異物を導入し取り込ませる方法を提供するものである。

【0006】本発明は、第2に、内蔵する開閉弁の作動時間を設定するコントローラ、該コントローラをオンすると設定された短時間のみ開閉弁が開いて制御用圧縮気体が流れて開く空気作動弁、空気作動弁を通過した作用用圧縮気体により作動して高圧圧縮気体源から高圧圧縮気体を供給するエアレススプレー塗装用自動ガン、開閉弁が閉じ制御用圧縮気体の供給が止まると経路内の制御用圧縮気体を速やかに排出するように作動するNOT素子および急速排気弁、該自動ガンの先端に取り付けられたノズルシステムおよび生物または細胞の固定手段よりなり、該ノズルシステムが所定の長さおよび内径を有するノズルチップ部の孔と該ノズルチップ孔の軸上これと順次連通する第1弁座、所定の長さおよび内径を有する第1内孔、第2弁座、および所定の長さおよび内径を有する第2内孔と前記第1弁座に連通するコックバルブ付異物保持微粒子挿入口とを有し、エアレススプレー塗装用自動ガンに装着されたノズルと、該エアレススプレー塗装用自動ガンの作動に応じて前記ノズルチップ孔の軸上前後に作動して前記第1弁座および第2弁座において開閉する弁体とより2段ニードル弁を構成してなるか、あるいは、該ノズルシステムが、所定の長さおよび内径を有するノズルチップの孔と該ノズルチップ孔の軸上これと順次連通する第1弁座、および所定の長さおよび内径を有する内孔と前記内孔に連通するコックバルブ付

異物保持微粒子挿入口とを有し、前記自動ガンに装着され、好ましくは該挿入口前において着脱自在に接続されたノズルと、該エアレススプレー塗装用自動ガンの作動に応じて前記ノズルチップ孔の軸上前後に作動して前記第1弁座および前記エアレススプレー塗装用自動ガンの高圧圧縮気体出口部に設けられた第2弁座において開閉する弁体とより2段ニードル弁を構成してなり、好ましくはさらに高圧圧縮気体源からエアレススプレー塗装用自動ガンに至るラインに、高圧調整用レギュレータ、高圧圧縮気体分岐ライン、高圧ガス用フィルタ、オンオフバルブおよび高圧アキュムレータを順次設け、前記高圧圧縮気体分岐ラインに低圧調整用レギュレータを設けてなり、該低圧調整用レギュレータにより減圧された低圧圧縮気体が制御用圧縮気体および作用用圧縮気体として用いられると共に所定の内圧に応じた所定の容積を有し、生物または細胞の固定手段を収納し、前記ノズルに着脱自在に接続して設けられた安全弁付チャンパー、該チャンパーで膨張し、該チャンパーを出る膨張気体に同封される飛散異物保持微粒子を分離回収する分離器、および該分離器で分離された気体を吸引して瞬時の昇圧を防止する真空度調整レギュレータおよび真空ポンプを設けてなる前記方法に使用する装置を提供するものである。

【0007】本発明において、生物または細胞内へ導入可能な異物の例としては、遺伝子、核酸、酵素などはじめ様々な化学薬品や試薬があげられるが、キャリアーとしての微粒子に吸着するものであれば特に制限はない。またキャリアーとしての微粒子表面に種々の修飾を付加することによりその他の試薬も導入可能となりうる。

【0008】本発明における導入可能な異物のキャリアーとしての微粒子の例として、鉄やタングステンをはじめとする金属微粒子、および石英等の無機微粒子、比重の高いポリマー微粒子などを挙げるのが出来る。これらの微粒子の大きさは対象となる生物または細胞によって異なるが、通常外径0.1 μm ~ 10 μm 程度である。

【0009】本発明における生物の例として、細胞壁の極端に硬くない植物一般、動物、組織培養細胞などをあげることができる。これらの生物は、好ましくはパラバラにした細胞をフィルター上に層状に固定した状態または塊りになった状態で異物保持微粒子が固定される。

【0010】本発明における細胞の例として、ヘラ(Hela)細胞等の動物細胞ならびに培養細胞、緑藻クロレラ、金どろの菌藻等の微菌藻類、カルス等の組織などがあげられる。

【0011】異物保持微粒子の打ち込みに際し、好ましくは、細胞はフィルター上に吸引濾過されて固定される。これらの細胞はフィルター上に固定可能なものならばどのような細胞も応用可能である。これらフィルター

7

上に固定された細胞の層の厚さは細胞の直径のおよそ2〜3倍になるようにするのが望ましいが、それ以上であっても微粒子の導入は可能である。これらのフィルター上の細胞は完全に乾燥させずハーフ・ウェット(half-wet)な状態で使用するのが望ましい。このフィルターはクーリングと接続されている固定盤上に固定される。このクーリングは0℃〜50℃まで温度変化の出来るものを用い、その温度変化はそのまま固定盤上で再現できるようにしている。固定細胞の温度変化は、0℃〜50℃の範囲で細胞の生存率が極端に低下しない範囲で異物担持微粒子を導入し取り込むことが可能となる。

【0012】本発明装置に用いられるコントローラーは、開閉弁、例えば電磁弁（以下電磁弁の例について記載する）を内蔵し、0.001〜9.999秒単位で電磁弁の作動時間を設定することができる。該コントローラーとして、例えば市販の岩下エンジニアリング製AD3000V コントローラーを用いることができる。コントローラーをオンすると設定された短時間の電磁弁が開いて制御用圧縮気体が流れ、空気作動弁が開く。圧縮気体作動弁を通過した作動用圧縮気体はエアレススプレー装置用自動ガン（アライエラ製）を作動させポンプあるいはポンプから自動ガンへ高圧圧縮気体が供給される。電磁弁が閉じ制御用圧縮気体の供給が止まるとNOT要素が働き急速排気弁から空気作動弁までの経路内の制御用圧縮気体を速やかに排出するため高圧圧縮気体の供給時間は短時間に制御することができる。

【0013】本発明方法における高圧圧縮気体としては、空素、空気、アルゴン、その他の不活性気体などがあげられ、その圧力は通常2〜300 kg / cm²、好ましくは10〜200 kg / cm²である。該圧力が300 kg / cm²を超えると装置上腐蝕性の問題を生じて好ましくなく、2 kg / cm²未満では生物の細胞膜および細胞壁を通過できる微粒子の確率が極端に低くなり実用的でないので好ましくない。本発明方法において、高圧圧縮気体は好ましくは10〜200 kg / cm²の圧力でノズルに供給され、ノズル先端から0.005〜0.01秒間、初速度100〜400 m/sec で異物担持微粒子と共に噴出される。

【0014】本発明の好ましい態様において用いられる高圧調整用レギュレータは、高圧圧縮気体源からの圧縮気体を2〜300 kg / cm²に圧力調整して任意の噴射速度を得ることができるものである。例えばデスコ社製商品名デスコ44-1115-24などをあげることができる。

8

【0015】本発明の好ましい態様において用いられる低圧調整用レギュレータは、分岐された高圧圧縮気体を1〜6 kg / cm²の範囲に減圧調整するもので、減圧調整された低圧圧縮気体は、コントローラー、空気作動弁、自動ガンなどを作動するための作動用圧縮気体として使用することが可能であり、具体例として、例えば、デスコ社製商品名デスコ44-1115-24などをあげることができる。別途コンプレッサーより7の圧縮気体を絞用レギュレータにより圧力調整して作動用圧縮気体として用いてもよい。

【0016】本発明の好ましい態様で使用されるオン・オフ手動バルブは、前記自動ガンへ供給される高圧圧縮気体をオン・オフするものであり、コントローラーなどが故障したとき不必要な高圧圧縮気体が自動ガン、チャンバーなどに入らないようにする安全上設けられたもので絞用高圧バルブを使用することができる。本発明の好ましい態様において使用される高圧ガス用フィルターは、高圧圧縮気体および配管内の汚れをろ過除去し、洗浄気体として自動ガンに供給するもので、例えば日本リポアリミテッド社製の高圧ガス用フィルター0.2 μm型ST00GCH00などがあげられる。

【0017】本発明の好ましい態様において使用される高圧アキュムレータは、前記自動ガンに供給される高圧圧縮気体の容量を設定するものであって、前記オン・オフ手動バルブと共に、コントローラーなどが故障したとき不必要な高圧圧縮気体がチャンバーなどに入らないようにするため安全上設けられたもので、例えば容量0.2〜1.3 リットルのサニー・トレーディング（株）製製品などがあげられる。

【0018】本発明のノズルシステムの第1の態様におけるノズルチップ部の孔の大きさは、導入されるキャリアーとしての微粒子、生物または細胞によって異なるが、通常内径0.5〜2mm、好ましくは1.0〜2mm、長さ1.0〜20mm好ましくは2.0〜10mmである。本発明のノズルシステムの第1の態様におけるノズルの第1内孔の大きさは、キャリアーとしての微粒子、生物または細胞によって異なるが通常内径1〜10mm、好ましくは1〜5mm、長さ5〜50mm、好ましくは10〜30mmで、この内径は第1内孔の2段ノズル弁の弁体の断面積を除く空間の断面積がノズルチップ孔の断面積の2.0〜5.0倍程度大きいことが異物担持微粒子の加速させる点で好ましい。本発明のノズルシステムの第1の態様におけるノズルの第2内孔の大きさは、特に制限されるものではないが、例えば内径2〜20mm、好ましくは2〜10mm、長さ5〜50mm、好ましくは10〜30mmである。本発明のノズルシステムの第1の態様におけるノズルを構成するコックバルブ付異物担持微粒子挿入口は、前記第1内孔に通じており、該異物担持微粒子挿入口に設けられたコックバルブを開いて異物担持微粒子を閉の状態にある第1内孔に装入された後閉じる。

9

該コックバルブで、高圧圧縮気体に耐えるため耐圧性であることが必要である。その大きさは特に制限されるものではないが、通常内径 0.5 ~ 2 mm である。本発明のノズルシステムの第 1 の態様におけるノズルには、ノズルチップ孔と第 1 内孔とに連通する第 1 弁座および第 1 内孔と第 2 内孔とに連通する第 2 弁座が設けられている。本発明のノズルシステムの第 1 の態様における 2 段ニードル弁は、前記ノズルと前記自動ガンの作用に応じてノズルチップ孔の軸上前後に作動して第 1 弁座および第 2 弁座において同時に開閉する弁体とより構成されている。

【0019】本発明のノズルシステムの第 2 の態様において、ノズルチップ孔は前記第 1 の態様と同様であり、内孔は内径 1 ~ 10 mm、好ましくは 1 ~ 5 mm であり、長さは全長 2 ~ 10 0 mm、好ましくは 30 ~ 70 mm であり、異物拒持微粒子挿入口は前記第 1 の態様におけると同様であり、該挿入口前において着脱自在に接続する方法としては、例えばネジ継手などの継手などを用いることができる。本発明のノズルシステムの第 2 の態様における第 1 弁座は、前記第 1 の態様におけるものと同様であり、2 段ニードル弁は、該第 1 弁座および前記自動ガンの高圧圧縮気体出口部に設けられた第 2 弁座と該第 1 および第 2 弁座において開閉する弁体とより構成されている。

【0020】図 2 a および 2 b は、本発明のノズルシステムの第 1 の態様における 2 段ニードル弁の作用を説明するための断面図であり、17 a は弁体、18 a はノズル、19 a はノズルチップ孔、20 a は第 1 弁座、21 a は第 1 内孔、22 a は第 2 弁座、23 は第 2 内孔、24 a は異物拒持微粒子挿入口であり、2 a 図は前記自動ガン 16 が停止状態のとき第 1 内孔 21 a が第 1 弁座 20 a および第 2 弁座 22 a において閉の状態にある場合を示し、2 b 図は前記自動ガン 16 の作用により第 1 内孔 21 a が開の状態にある場合を示している。

【0021】図 2 c は、本発明のノズルシステムの第 2 の態様における 2 段ニードル弁の作用を説明するための断面図であり、図 2 c において、17 b は弁体、18 b はノズル、19 b はノズルチップ孔、20 b は第 1 弁座、21 b は内孔、22 b は第 2 弁座、24 b は異物拒持微粒子挿入口、25 は継手であり、前記自動ガン 16 の作用により、弁体 17 b が前後に作動して第 1 弁座 20 b および第 2 弁座 22 b において内孔 21 b が閉じたり開いたりするようになっている。使用後継手 25 の部分でノズル 18 b を取り外して異物拒持微粒子などで汚染された弁座などを容易に掃除して良好な性能を維持することが可能であり、また所望のノズルと容易に交換することができる利点がある。

【0022】本発明方法において、異物拒持微粒子をノズルの前記第 1 内孔に装入するにあたっては、そのまま装入することも可能であるが、異物安定剤を含む緩衝液

10

などの懸濁液としてマイクロシリンジ、ピペッターなどを用いて装入するのが異物のノズル内での安定性および異物の変質防止の点で好ましい。

【0023】本発明装置における生物または細胞を固定する手段は、それにより生物または細胞が吸引る過渡して固定されるフィルターよりなり、このフィルターはクールニクスと接続されている固定盤上に固定される。このクールニクスは 0℃ ~ 50℃ まで温度変化のできるものを使用し、その温度変化はそのまま固定盤上で再現できるようにしている。温度制御はサーモスタットで行なうことができる。上記固定盤上に固定された生物または細胞を入れた容器をノズル軸上ノズル先端より一定の距離、例えば 10 ~ 100 mm を置いて例えばリフターなどにより調整して設定することができる。好ましくは、これらの生物または細胞が入り容器、リフターなどは、ノズル先端部に着脱自在に取り付けられたチャンパー内に装着する。該容器として例えばシャーレーなどを用い、シャーレーガイドでセットすることができる。

【0024】本発明の好ましい態様において使用されるチャンパーは、前記ノズルの先端から噴出される高圧圧縮気体および噴出される異物拒持微粒子のうち周囲に飛散する部分を受け入れて飛散する異物拒持微粒子による汚染を防止すると共に噴出する高圧圧縮気体を膨張減圧させるためのものである。該チャンパーには、前記高圧圧縮気体の供給制御装置が作動不良などを起したとき安全策として安全弁が設けられる。該安全弁付チャンパーの容積は、特に制限されるものではないが、耐圧および小型化を考慮し、例えば噴出する高圧圧縮気体の圧力 200 kg/cm² および噴出時間 0.05 秒の場合、2 ~ 5 リットルが好ましい。上記チャンパーには、前記したように例えばリフターなどでセットされた生物または細胞入り容器が装着されている。該チャンパーは、ノズル軸上ノズル先端部に着脱自在に接続されている。

【0025】本発明の好ましい態様において使用される分離器は、従来公知の気液分離器を使用することが可能であるが、例えば分離器顶部より分離器内に挿入され、分離器内に飛散異物拒持微粒子を同挿する気体を導入するパイプ、導入された飛散異物拒持微粒子を捕捉するために分離器底部に入れた水などの液体および飛散異物拒持微粒子が除去された気体を排出するための分離器顶部に設けられた排出口より構成されるものを用いることが可能であり、該パイプの先端と液面との距離は通常 1 ~ 20 mm であるが分離効果が小さい場合はパイプを液中に入れてもよい。

【0026】本発明の好ましい態様において使用される真空ポンプは、前記分離器で分離された気体を吸引して瞬時の昇圧を防止し、ひいては飛散する異物拒持微粒子による汚染を防止するものである。該真空ポンプとしては、公知のものを使用できるが、例えば島田科学器機製作所製商品名 VP0600 (真空度 -600 mmHg) などがあ

11

られる。真空ポンプの作動にあたっては、真空度調整レギュレータを設けて真空度を例えば -600 mmHg 程度に設定することができる。

【0027】本発明の方法および装置について、図1、前記図2 a~2 cを参照して以下説明する。図1は、本発明の方法および装置の好ましい態様の1例を示す概略図である。図2 a~2 cは前記の通りであり、図1において、1は電源、2はスイッチ、3はコントローラ、4は減圧弁、5はNOT素子、6は空気作動弁、7 aおよび7 bは急速排気弁、8は自動ガソフ作動用気体、9は高圧圧縮気体源、10は高圧調整用レギュレータ、11は高圧圧縮気体分岐ライン、12は低圧調整用レギュレータ、13はオンオフバルブ、14は高圧アキュムレータ、15は高圧圧縮気体ライン、16はエアレスブレーキ用自動ガン、18 aはノズル、24 aは異物保持微粒子挿入口、26はチャンパー、27は安全弁、28は生物または細胞入り容器、29はリフター、30は分離器、31はパイプ、32は液体、33は真空度調整用レギュレータ、34は真空ポンプ、35は排気口、36は高圧ガス用フィルターである。図1、図2 a~2 cにおいて、例えば、コントローラ3により、0.01秒単位で、コントローラ3内の電磁弁の作動時間を設定し、コントローラ3をオンすると、設定された短時間のみ電磁弁が開いて低圧調整用レギュレータ12により調整された制御用圧縮気体が流れ、コントローラ3により制御されている空気作動弁6が開き、これを通過した作動用圧縮気体8はエアレスブレーキ用自動ガン16を動作させポンプなどの高圧圧縮気体源9から、高圧調整用レギュレータ10を通過して高圧圧縮気体が直接自動ガン16へ、好ましくは、高圧調整用レギュレータ10を通過し、さらに高圧ガス用フィルター36およびオンオフバルブ13を通過した後オンオフバルブ13をオフとし、オンオフバルブ13より高圧アキュムレータ14を通過して自動ガン16に至るラインの高圧圧縮気体が、自動ガン16へ供給される。このようにして自動ガン16を通過して前記ノズルシステムの第1の態様におけるノズルの第2内孔23まで供給された高圧圧縮気体は、自動ガン16の作動によって前記2段ニードル弁が開く状態となると第1内孔21 aに供給され、あらかじめ異物保持微粒子挿入口24 aより第1内孔21 a内に装入されていた異物保持微粒子と共にノズル18 aの先端より噴出され、噴出した異物保持微粒子が生物または細胞入り容器28中の生物または細胞に打ち込まれる。電磁弁が閉じ制御用圧縮気体の供給が止まるとNOT素子5が働き急速排気弁7 aまでの経路内の作動用圧縮気体を速かに排出するので高圧圧縮気体の供給時間は、0.001秒程度の短時間に制御することが可能である。このように、0.01秒までオンオフの設定が可能なコントローラ3によって制御されている空気作動弁6が開閉することにより最高 300 kg/cm^2 の高圧圧縮気体

12

を噴出・停止することができる。細胞または生物の試料を入れた容器28は温度調節台（図示せず）上にあって最適な温度状態で異物保持微粒子が導入されるようになっている。本発明の好ましい態様によれば、ノズル18 aの先端より噴出された気体および生物または細胞に打ち込まれ周囲に飛散する異物保持微粒子前記チャンパー26を通り、分離器30に送られて、飛散異物保持微粒子は分離器30内の液体32中に捕捉・除去され、飛散異物保持微粒子が除去された気体のみ真空度調整用レギュレータ33および真空ポンプ34を通過して排気口35より排出される。

【0028】

【発明の効果】本発明によれば、ノズルの先端から噴出される異物保持微粒子の噴出方向が水平方向に限定されることがないこと、ノズル内への異物保持微粒子の装着が容易であること、ノズルへ供給される高圧圧縮気体の制御システムに故障などの異常が生じても自動ガン以降に及ばされる悪影響を防止することができること、異物保持微粒子によるノズルシステムの汚染を容易に除去することが可能であること、生物または細胞に打ち込まれないで周囲に飛散する異物保持微粒子による汚染を解消することが可能であることなどの利点を有する生物または細胞に異物を導入し取り込ませる方法および試方法に使用する装置が提供される。

【0029】

【実施例】以下実施例により本発明を詳細に説明する。

【0030】実施例1

内径1.5mmおよび長さ5mmのノズルチップ内孔、内径5mmおよび長さ10mmの第1内孔および内径8mmおよび長さ10mmの第2内孔と、外径2mmの弁体とより構成され、図2 aおよび図2 bに示すような形状の2段ニードル弁をエアレスブレーキ用自動ガン（アロイ工器製）に装着させ、クロレラ遺伝子 $1\mu\text{g}$ を粒径 $0.6\mu\text{m}$ のタングステン微粒子10 μm に担持し、緩衝液に懸濁させて懸濁液とし、該懸濁液を異物保持微粒子挿入口よりマイクロシリンドリを用いて前記第1内孔へ挿入した。一方、電磁弁を内蔵するコントローラ（岩田計装工業製、AD3000V）により電磁弁作動時間を0.005秒に設定し、N₂ガスボンベよりのN₂ガスの圧力を高圧調整用レギュレータ（テスコ社製、44-115-24）で 200 kg/cm^2 に設定して高圧圧縮気体とすると共に、その1部を分岐し、その分岐ラインにおける低圧調整用レギュレータ（テスコ会社製、44-115-24）で 5 kg/cm^2 に設定してコントローラ側の作動用圧縮気体とし、コントローラをオンしてエアレスブレーキ用自動ガンおよび前記ニードル弁を動作させ、第1内孔に装着されているクロレラ遺伝子を持つタングステン微粒子を高圧N₂圧縮気体と共にノズル先端より噴出させて前記固定手段に装着されている上記細胞に打ち込んだ。その結果、作動用圧縮気

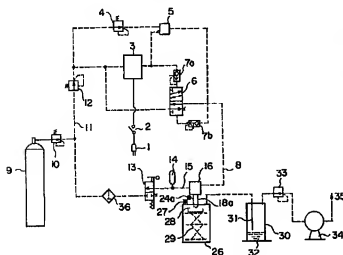
13

体の作動時間が極めて短いので気流による細胞の飛散程度は極めて小さく、かつ良好にクロレラ遺伝子担持タングステン微粒子が上記細胞に導入された。

【0031】実施例2

容量5リットルのチャンパー、底部に水を入れた容量6リットルの分離器、真空度を-600mmHgに設定した真空度調整レギュレータ（島田科学器機製作所製）および真空ポンプ（島田科学器機製作所製、商品名VP0660）を用いて、前記細胞に取り込まれないで飛散したクロレラ遺伝子担持タングステン微粒子を前記噴出気体より分離回収した以外実施例1と同様の実験を行なった結果、飛散したクロレラ遺伝子担持タングステン微粒子は上記分離器で完全に分離回収された。

【図1】



14

【図面の簡単な説明】

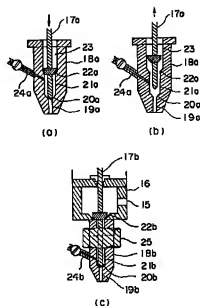
【図1】本発明の方法および装置の好ましい態様の1例を示す概略図である。

【図2a】本発明のノズルシステムの第1の態様における2段ニードル弁の作動を説明するための断面図である。

【図2b】本発明のノズルシステムの第1の態様における2段ニードル弁の作動を説明するための断面図である。

【図3a】本発明のノズルシステムの第2の態様における2段ニードル弁の作動を説明するための断面図である。

【図2】



【手続補正書】

【提出日】平成4年1月23日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図面の簡単な説明

【補正方法】変更

【補正内容】

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の方法および装置の好ましい態様の1例を示す概略図である。

【図2a】本発明のノズルシステムの第1の態様における2段ニードル弁の作動を説明するための断面図である。

【図2b】本発明のノズルシステムの第1の態様における2段ニードル弁の作動を説明するための断面図である。

【図2c】本発明のノズルシステムの第2の態様における2段ニードル弁の作動を説明するための断面図である。